

研究期間	： 2020年度～2024年度
課題番号	： 20H05690
研究課題名	： 転写と中核的な生命機能をつなぐ高次複合体の構造基盤
研究代表者氏名（ローマ字）	： 関根 俊一（SEKINE Shun-ichi）
所属研究機関・部局・職	： 国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー
研究者番号	： 50321774

研究の概要：

DNA の遺伝情報を RNA に転写する巨大なタンパク質複合体である RNA ポリメラーゼは、細胞内の様々な分子と相互作用し、多様な生命機能を支えるハブとして機能している。本研究では、RNA ポリメラーゼを中心に、ヌクレオソームやエピジェネティクス因子、転写因子、RNA プロセッシング因子、リボソーム等を含めた超複合体の構造解析を行い、転写に関連した重要な生命機能の構造基盤を解明する。

研究分野：構造生物化学

キーワード： RNA ポリメラーゼ、ヌクレオソーム、転写伸長因子、ヒストンシャペロン、リボソーム、転写終結因子、クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

遺伝子に保存された DNA の塩基配列を読み取って RNA を合成する転写のプロセスは、生命の根幹をなすものである。転写を担う RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、分子量 400~700 kDa におよぶ巨大なタンパク質複合体であるが、それ単独では転写を遂行することはできない。転写は、プロモーターからの転写開始から転写伸長、終結へと至る、多段階かつ高度に制御されたプロセスであるが、各段階において RNAP は結合するパートナー（＝転写因子など）を随時交換して異なる高次複合体を形成し、構造と機能をダイナミックに切り替えることで転写を遂行している。また、真核生物の細胞核内では、RNA ポリメラーゼ (RNAP II) は、裸の DNA ではなく、高度に組織化されたクロマチン内で転写を行い、かつ真核生物に固有の転写制御を受けている。さらに、mRNA 前駆体のプロセッシングは、RNAP II を足場にして転写と連動して行われる。一方、細菌では、転写は翻訳と連動しており、転写終結因子との連携による高度な制御が行われている。しかしながら、これらの事象が分子レベルでどのように達成されているか、十分な知見は得られていない。近年のクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) 技術の急速な進歩により、このように複雑な研究対象にアプローチすることが可能になりつつあり、構造基盤を高分解能で解明しようという機運が国内外で高まっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写が行われる場において、RNAP がクロマチンや他の様々な要素とどのように関連し、影響を及ぼしあっているのか、その構造基盤を高分解能で明らかにすることである。細胞内の状態を再現した高次複合体を調製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、クロマチン内での転写や制御、転写と隣り合う他のプロセスとの相互作用や連携の構造基盤を解明する。特に、ヌクレオソームの転写とエピジェネティクスの維持、高次の制御、mRNA 成熟プロセスとの連携、細菌における転写と翻訳の共役に焦点を当てる。

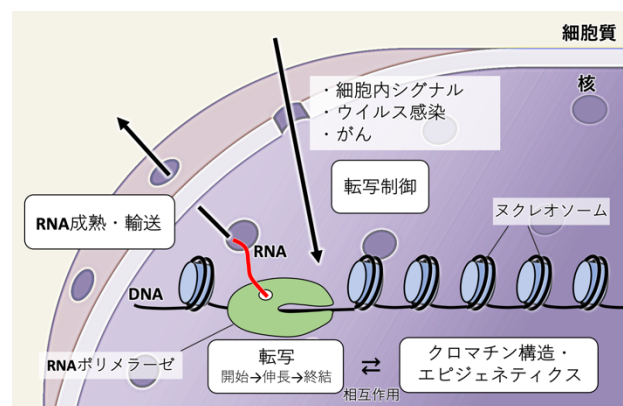


図1. 転写とそれに関連する様々な事象

3. 研究の方法

真核生物において、RNAP II による転写はクロマチン構造をとった DNA 上で行われる。また、転写は多数の因子や修飾等によって高度な制御を受けている。さらに、mRNA 前駆体のプロセッシングは、

転写と連動して行われる。我々はこれまでに、RNAP II の転写伸長複合体やヌクレオソームを転写中の RNAP II の構造等、細胞内での姿を反映した複合体を試験管内で再現し、その構造をクライオ電子顕微鏡によって解析する手法を確立してきた。本研究では、転写伸長因子やヒストンシャペロン、転写制御因子、プロセッシングに関わる酵素等を含む より高次の機能的複合体の再構成を試み、それらの構造解析を行って分子メカニズムの詳細を理解する。

細菌に固有の現象として、遺伝子領域における転写と翻訳の連携（転写-翻訳共役）が知られている。一方、非翻訳領域からの転写は転写終結因子によって恒常的に抑制されており、遺伝子発現の正確性が保たれている。本研究では、リボソームや転写終結因子と RNAP との複合体を再現し、構造解析を行うことにより、この巧妙な遺伝子制御の構造基盤を解明する。

4. これまでの成果

真核生物の核内では、DNA はヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を形成している。RNA ポリメラーゼ II (RNAP II) は、ヌクレオソーム構造を保持しながら DNA の転写を行うことができるが、これはクロマチン構造やヒストン修飾等のエピジェネティック情報を維持するために必須である。RNAP II がヌクレオソームを通過する際には、ヌクレオソームは一時的に解体され、RNAP II の背後で再形成されると考えられているが、その詳細は不明であった。このプロセスに関与するヒストンシャペロンや複数の転写伸長因子等を用いて RNAP II にヌクレオソームを転写させ、その際に形成される複合体の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて解析することで、RNAP II がヌクレオソームを通過する過程のスナップショットを捉えることに成功した。RNAP II は転写伸長因子を結合して巨大な転写伸長複合体を形成し、ヒストンシャペロンの助けを借りて下流のヌクレオソームを段階的に解体し、上流側で再形成することが明らかになった。この結果は、RNAP II がいかにしてヌクレオソーム構造やエピジェネティック情報を失わずにクロマチンを転写できるのか、という大きな謎に世界で初めて回答を与えるものである。

細菌の転写終結因子 Rho は ATP 依存性 RNA ヘリカーゼであり、ホモ 6 量体のリング状の構造をとる。リングの中央のチャンネルに RNA を通して 5'→3' 方向に移動して RNAP に結合し、RNAP から RNA/DNA を解離させる。高度好熱菌の RNAP と転写終結因子 Rho を用いて Rho 依存的転写終結を再現する系を確立し、両者の複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定することに成功した。Rho のリングは RNAP の RNA の排出口を取り囲むように結合し、排出口から排出される新生 RNA 鎖はリング中央の穴にシームレスに導かれていた。変異体解析により、Rho と RNAP のタンパク質間の相互作用の重要性が示唆された。この構造は最近報告された RNA を結合していない大腸菌の RNAP-Rho 複合体の構造とは大きく異なっており、初めて転写終結直前の構造を捉えたものと考えられる。

5. 今後の計画

真核生物の転写に関しては、これまでの結果も踏まえ、より高度な制御に関わる因子や RNA プロセッシング因子、修飾酵素等も含めた複合体の再構成および構造解析を行い、転写と重要な生命機能との相互連関の構造基盤を明らかにしていく。

細菌の転写については、転写-翻訳複合体の再構成および構造解析を進め、転写終結複合体と比較して最近に固有の制御の構造基盤を得る。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

Sekine, S., Uejima, T. and Ehara, H. (2021) "RNA polymerase-associated transcription elongation factors" in RNA Polymerases as Molecular Motors 2nd Edition, eds. Landick, R., Strick, T. and Wang, J. (Royal Society of Chemistry)

7. ホームページ等

理化学研究所 生命機能科学研究センター 転写制御構造生物学研究チーム
<https://www.bdr.riken.jp/jp/research/labs/sekine-s/index.html>